

집적형 DNA칩 어레이 및 비수식화 DNA를 이용한 유전자 검출

최 용성, 이 경섭  
 동신대학교 전기공학과

Integrated Type DNA Chip Array and Gene Detection Using an Indicator-free DNA

Yong-Sung Choi, and Kyung-Sup Lee  
 Department of Electrical Engineering, DongShin University

**Abstract** - This research aims to develop the multiple channel electrochemical DNA chip that has the above characteristic and be able to solve the problems. At first, we fabricated a high integration type DNA chip array by lithography technology. It is able to detect a plural genes electrochemically after immobilization of a plural probe DNA and hybridization of non-labeling target DNA on the electrodes simultaneously.

다. 고정화반응 후, 순수로 금전극을 세척하여 비특이적으로 결합한 probe DNA를 제거하였다.

hybridization 버퍼로서 Tris-HCl를 조제하여 사용하였다. 1aM~50μM 농도의 target DNA를 마이크로 피펫을 사용하여 금전극에 스폿하고, 프로브스테이션을 사용하여 금전극에 (+)0.3V의 전압을 5초간 인가하여 probe DNA와 hybridization시켰다. 그리고, 금전극은 순수로 세척하여 비특이적으로 결합한 target DNA를 제거하였다.

1. 서 론

DNA칩은 복수의 유전자를 동시에 해석하는 수단으로서 개발되었다. 유전학의 진보에 의하여 유전병이나 암과 같은 유전자가 직접 관여하는 유전자 질병에 한정되지 않고, 고혈압이나 당뇨병 등의 생활습관병에 대해서도 유전자가 영향하여 발병됨이 밝혀지고 있다<sup>[1]</sup>. 이 때문에, 질병에 관여하는 유전자의 해석은 병의 조기발견·조기치료를 하는데 매우 중요하다. 아직 윤리적으로 해결해야할 문제는 남아있으나, 급후 유전자 진단에의 기대는 높아지고 있다. 또한, 유전자다형, 특히 일염기치환다형 (Single Nucleotide Polymorphism : SNP) 해석은 생물종 개체간의 다양성을 고찰하는데 도움이 되며, 계열학·분류학에 중요한 지식을 줄 것이다.

바이오칩은 질병의 판정·예방을 목적으로 한 유전자진단을 추진하고, 생물의 유전자다형 (SNP)에 관한 각종 지식을 가져올 것으로 기대된다<sup>[2-4]</sup>. 종래의 형광검출형 바이오칩을 사용하여 대상 유전자의 발현을 해석하기 위해서는 수만개의 유전자 단편을 준비하여 기판상에 고밀도로 배치시킬 필요가 있으나, 제조장치와 해석장치가 고가이므로, 일부 연구기관이나 병원에서만 사용되고 있지 않다.

따라서, 본 연구에서는 형광검출형 바이오칩에 비하여 간편성, 휴대성, 개발코스트의 면에서 우수한 미세전극어레이형 바이오칩의 개발을 목적으로 한다. 이 목적을 실현시키기 위하여 고집적형 바이오센서의 제작에 필수불가결한 미세가공기술에 의하여 복수의 미세전극을 병렬로 배치시킨 바이오칩을 제작하였다. 전극상에는 각종 유전자를 고정화하고 복수의 유전자를 동시에 검출하였다. 그리고, 최종적으로 제작된 바이오칩을 사용하여 신속·간편한 임상유전자 검사에 응용하고자 한다.

2. 시료 및 실험방법

2.1 시약

5'에 SH기가 수식된 5'-HS-AGGCTGCTCCCC C GTGGCC-3'의 염기배열을 갖는 SH-p72, 5'-HS-AAAGCTGCTCCCCCGTGGCC-3'의 염기배열을 갖는 SH-m72 및 5'-HS-AGGCTGCTCCCCGC GTGGCC-3'의 염기배열을 갖는 SH-R72이 사용되었다. 그리고, 이들 probe DNA와 상호적인 target DNA [p72: 3'-TCCGACGAGGGGGCACC GG-SH -5', m72: 3'-TTCGACGAGGGGGCACC GG-5' 및 R72: 3'-TCCGACGAGGGGGCACC GG-5']를 합성하고 정제하여 5.0μM의 농도로 하여 사용하였다. 합성된 DNA는 TE버퍼 (10mmol/L Tris-HCl pH8.0, 1mmol/L EDTA pH8.0)에 보존하였다.

기판의 세척은 초순수 및 특급아세톤·에탄올 (Wako Pure Chemical Co., Inc.) 또는 전자공업용 아세톤 (Kanto Chemical Co., Inc.)을 사용하였다. 포토리소그라피에 사용한 포토저장 레지스트는 S1818 (SHIPLEY), 현상액은 MF-319 (SHIPLEY) 및 remover는 1165 (SHIPLEY)를 사용하였다. 센서기판을 제작하기 위하여 두께 1.2~1.5mm, 76x26mm의 SLIDE GLASS (MATSUNAMI)를 사용하였다.

2.2 probe DNA의 고정화 및 target DNA의 hybridization

probe DNA의 고정화는 마이크로피펫을 사용하여 금전극에 5.0μM, 1.0μl의 용액을 스폿하여 25℃에서 2시간동안 반응시켜 고정화시켰

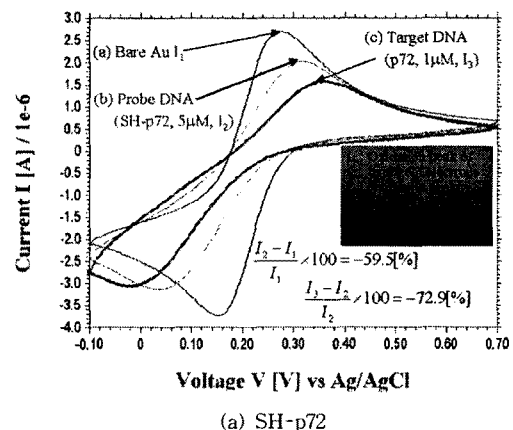
2.3 전기화학측정

전기화학측정에는 CHI의 Model 1030와 컴퓨터 시스템을 사용하였다. Cyclic-voltammetric (CV) 측정에는 전형적인 셀, counter 전극인 Pt, reference 전극인 Ag/AgCl 및 working 전극으로 Au를 사용하였다. 전기화학측정은 500mM의 황산용액으로 전형적인 황산의 산화·환원피크가 관측될 때까지 25℃, -0.2~1.7V범위에서 100mV/s의 조건으로 스캔하여 표면을 cleaning한 후에 실시하였다. CV측정은 ferricyanide [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] 용액중에서 금전극, probe DNA고정후 및 target의 DNA hybridization후 실시하였다. ferricyanide용액의 5회CV의 산화·환원값을 피크값으로 하였다.

3. 결과 및 검토

그림 1은 bare 금전극에 probe DNA를 고정화하고, target DNA를 hybridization시켰을 때, ferricyanide용액의 산화·환원피크의 변화를 측정된 결과이다. 그림 1 (a)는 SH-p72의 probe DNA를 고정화하고, 이의 target DNA (p72)를 hybridization시켰을 때, ferricyanide용액의 산화·환원피크의 변화를 측정된 결과이다. 그림 1 (a)에서 probe DNA를 고정하였을 때, 산화피크 (I<sub>pa</sub>)는 59.5% 감소하였다. 또한, peak-to-peak separation (E<sub>p</sub>)는 증가하였다. 이는 probe DNA가 금전극에 고정화되어 ferricyanide 이온의 산화·환원을 방해한 것으로 생각된다. 한편, probe DNA가 고정된 전극에 target DNA를 hybridization시켰을 때는 산화피크는 72.9% 감소하였다.

한편, SH-m72, SH-R72를 probe DNA로 하고, 이것과 비상호적인 target DNA인 p72를 hybridization시켰을 때, ferricyanide용액의 산화·환원피크의 변화를 측정된 결과를 그림 1 (b)와 (c)에 각각 나타내었다. 금전극에 probe DNA를 고정하였을 때, 산화피크는 각각 86.4%, 21.1% 감소하였다. 또한, peak-to-peak separation (E<sub>p</sub>)는 증가하였다. 한편, probe DNA가 고정된 전극에 비상호적인 target DNA를 hybridization시켰을 때는 산화피크는 각각 8.9%, 21.5% 감소하였다.



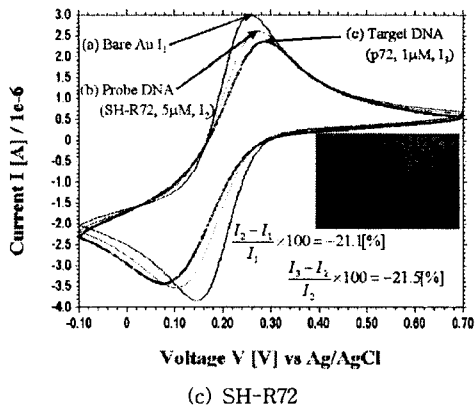
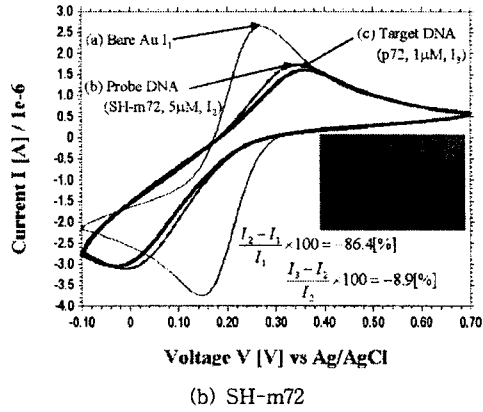


Figure 1. Cyclic-voltammograms of 5mM ferricyanide in 100mM KCl at 100mV/s using a bare gold, probe-modified electrode and after hybridization with target DNA.

그림 1 (a), (b) 및 (c)의 결과로부터, 상호적인 DNA와 비상호적인 DNA를 hybridization시켰을 때, 산화값은 72.9%, 8.9% 및 21.5 감소하였으며, 상호적인 DNA (SH-p72:p72)를 hybridization시켰을 때, 산화값이 가장 많이 변화하였으며, 다음으로 SH-R72와 p72이었다. 이는 SH-R72과 p72가 guanine 2중나선을 형성하기 때문으로 생각된다.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 1) 마이크로어레이의 개발을 목적으로 probe DNA 고정화법의 검토, 2) target DNA에 일체의 수식을 하지않는 비수식DNA를 이용한 미소전극어레이형 바이오칩을 제작 및 3) 동시에 복수의 유전자를 전기화학적으로 검출하는 방법에 대하여 검토하였다. 즉, 1) 기판상에 정량적으로 고정화된 probe DNA에 대해서 target DNA를 hybridization시키고, 2) 전기화학적 측정에 의하여 hybridization을 정량화하는 실험계를 개발하여, probe DNA와 target DNA를 식별하였다.

#### 감사의 글

“본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R08-2003-000-10312-0) 지원으로 수행되었음.”

#### [참 고 문 헌]

- [1] 古庄敏行 他, 「臨床DNA診斷法」, 金原出版, 1995.
- [2] S.P.A. Fodor, J.L. Read, M.C. Pirrung, L. Stryer, A.T. Lu, D. Solas, "Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis", Science, 251, 767-773, 1991.
- [3] S.P.A. Fodor, R.P. Rava, X.C. Juang, A.C. Pease, C.P. Holmes, C.L. Adams, "Multiplexed biochemical assays with biological chips", Nature, 364, 555-556, 1993.
- [4] Emil Palecek, Miroslav Fojta, Miroslav Tomschik, Joseph Wang, "Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage", Biosensors & Bioelectronics, 13, 621-628, 1998.